Saggio MiSeqDx™ Cystic Fibrosis 139-Variant

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. catalogo DX-102-1004: 2 corse, fino a 96 campioni per kit

N. catalogo DX-102-1003: 20 corse, fino a 960 campioni per kit

Uso previsto

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è un sistema diagnostico qualitativo *in vitro* per rilevare simultaneamente 139 varianti significative dal punto di vista clinico delle mutazioni che causano la fibrosi cistica e le varianti del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) in DNA genomico isolato da campioni di sangue umano periferico. Le varianti includono quelle raccomandate nel 2004 dall'American College of Medical Genetics (ACMG)[1] e nel 2011 dall'American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)[2]. Il test è previsto per lo screening di portatori negli adulti in età riproduttiva, in analisi diagnostica di conferma nei neonati e nei bambini e come test iniziale per contribuire nella diagnosi di individui con sospetta fibrosi cistica. I risultati di questo test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni cliniche e di laboratorio disponibili.

Questo test non è indicato per la diagnosi neonatale, la diagnosi prenatale, l'analisi pre-impianto o per fini diagnostici indipendenti.

Il test deve essere usato sullo strumento MiSeqDx Illumina.

Riassunto e spiegazione del saggio

Descrizione clinica

La fibrosi cistica (CF) è una delle malattie genetiche più comuni nel mondo occidentale ed è la malattia autosomica recessiva potenzialmente letale più comune nella popolazione bianca non ispanica[3-7]. La fibrosi cistica incide sulla viscosità delle secrezioni mucose e influenza l'epitelio del tratto respiratorio, del pancreas, dell'intestino, del sistema epatobiliare, del tratto genitale maschile nonché le ghiandole sudoripare causando una complessa patologia multisistemica e multiorgano[4-6] nella quale i polmoni sono il sistema d'organi principalmente associato a morbilità e mortalità[8]. In molti casi, un declino nutrizionale preannuncia una progressione della malattia polmonare dovuta alla fibrosi cistica; pertanto, un elemento fondamentale delle attuali strategie di intervento è la diagnosi precoce tramite screening neonatale[7], che favorisce un accesso tempestivo ai servizi medici fondamentali e consente di ottenere il miglior risultato possibile per gli individui affetti dalla patologia[4,7]. Benché vi siano differenze tra i sessi per quanto riguarda la sopravvivenza e venga riferita una sopravvivenza mediana superiore per gli uomini rispetto alle donne, negli Stati Uniti la sopravvivenza mediana generale è di 38,3 anni[8].

Varianti del gene *CFTR* e incidenza

Il gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) identificato nel 1989 si trova sul braccio lungo del cromosoma 7 e contiene 27 esoni codificanti distribuiti su oltre 230 kb[4]. Un mRNA di 6,5 kb prodotto dall'allele normale codifica il gene CFTR, una proteina integrale di 1490 aminoacidi situata sulla membrana che funziona come canale di cloro regolato nelle cellule epiteliali di più organi[4,5]. Attualmente sono state descritte oltre 1900 varianti del gene *CFTR*. Per la maggior parte si tratta di mutazioni puntiformi[9]. La variante del gene *CFTR* più comune è l'allele F508del[5], che rappresenta quasi il 70% di tutte le varianti del gene *CFTR*[3]. Tuttavia altre varianti comuni del gene *CFTR* spesso determinano un fenotipo CF e altre patologie correlate a CFTR[3-5].

La fibrosi cistica ha un'incidenza di malattia stimata pari a un caso ogni 2.000 - 4.000 nati vivi e una prevalenza di circa 30.000 individui nella popolazione statunitense[4]. Si verifica in tutte le etnie e razze con frequenze diverse: un caso ogni 3.000 caucasici, un caso ogni 9.200 ispano-americani, un caso ogni 10.900 nativi americani, un caso ogni 15.000 afroamericani, e un caso ogni 31.000 asioamericani[4,6]. La Tabella 1 fornisce le stime attuali della frequenza dei portatori della mutazione del gene CFTR in base all'etnia negli Stati Uniti, basate su una coorte di 364.890 individui testati per il portatore senza anamnesi familiare di fibrosi cistica.

Tabella 1 Frequenza generale del portatore della mutazione della fibrosi cistica in diversi gruppi etnici negli Stati Uniti[10]

Gruppo etnico	Frequenza del portatore osservata
Afroamericano	1 su 84
Ebrei aschenaziti	1 su 29
Asiatico	1 su 242
Caucasico	1 su 28
Ispanico	1 su 59
Ebreo	1 su 32
Medio orientale	1 su 91
Nativo americano	1 su 70
Sudasiatico	1 su 118
Altra etnia	1 su 111
> 1 etnicità	1 su 34
Parte afroamericano	1 su 56
Parte caucasico	1 su 32
Parte ispanico	1 su 51
Non fornito	1 su 37
Tutti gli individui	1 su 38

Panoramica del progetto CFTR2

Il progetto CFTR2 è un'iniziativa internazionale guidata da un team di ricercatori e medici e supportata dal National Institute of Health e dalla fondazione statunitense Cystic Fibrosis Foundation.[11,12] CFTR2 mira a fornire informazioni complete e riviste da esperti sulle varianti funzionali e cliniche del gene *CFTR*. In uno sforzo per convalidare clinicamente tutte le varianti CF con frequenze alleliche di 0,01% e di percentuali superiori, 25 archivi e cliniche CF da tutto il mondo[13] hanno unito le proprie risorse con lo scopo di confrontare le informazioni cliniche di più di 39.000 pazienti affetti da fibrosi cistica con circa 1.900 varianti del gene CF che sono stati registrati negli anni nel database CFTR1 dell'ospedale Hospital for Sick Children di Toronto.[11,13] Le caratteristiche cliniche, come concentrazione di cloro nel sudore (% FEV1 prevista) e stato del pancreas sono stati analizzati assieme alle informazioni del genotipo *CFTR*. L'approccio sistematico di analisi simultanea di queste varianti da una prospettiva clinica, funzionale e genetica ha prodotto 134 varianti univoche causanti la fibrosi cistica a 129 posizioni genomiche univoche (poiché per cinque posizioni, due cambiamenti del nucleotide appaiono sulla stessa posizione) attualmente contenute nel database CFTR2 (ad agosto 2013). L'uso di un pannello comprendente tutte queste varianti si prevede che equivalga al 95,4% degli alleli che causano la fibrosi cistica e, mediante il rilevamento di entrambi gli alleli, aumenta a circa il 91% l'identificazione di coppie a rischio rispetto al 72% usando il pannello di 23 varianti raccomandato dall'ACMG (American College of Medical Genetics).

Varianti del gene *CFTR* nel pannello

Le varianti riportate dal saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono state specificatamente scelte perché rappresentano il gruppo completo di varianti convalidate clinicamente classificate come causanti la fibrosi cistica nel database CFTR2 presso la Johns Hopkins University, un prodotto dell'iniziativa di CFTR2 (Clinical and Functional Translation of CFTR).

Il saggio testa: 134 varianti che causano la fibrosi cistica; una variante del pannello raccomandata dall'ACMG (R117H, classificata come mutazione di varie conseguenze cliniche, MVCC, da CFTR2); una variante modificante riportata condizionatamente (PolyTG/PolyT); e tre varianti benigne riportate condizionatamente (I506V, I507V, F508C)[14]; per un totale di 139 varianti riportate.

Le 134 varianti che causano la fibrosi cistica corrispondono a 129 varianti che causano la fibrosi cistica contenute nel database CFTR2. Il database CFTR2 include cinque varianti che causano la fibrosi cistica per le quali lo stesso cambiamento nel livello della proteina può verificarsi da due cambiamenti distinti del nucleotide [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. Queste cinque varianti sono elencate in base al codone di aminoacido nel database CFTR2 (ad es., S466X) mentre il saggio riporta ciascuna singola variante [ad es., S466X(C>A) e S466X(C>G)]. L'elenco delle 139 varianti riportate dal saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant sono fornite nella Tabella 2.

Tabella 2 Riepilogo delle varianti per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant
[Elencate in base alle coordinate genomiche; **Grassetto**=ACMG-23; *Corsivo*=riportate condizionatamente]

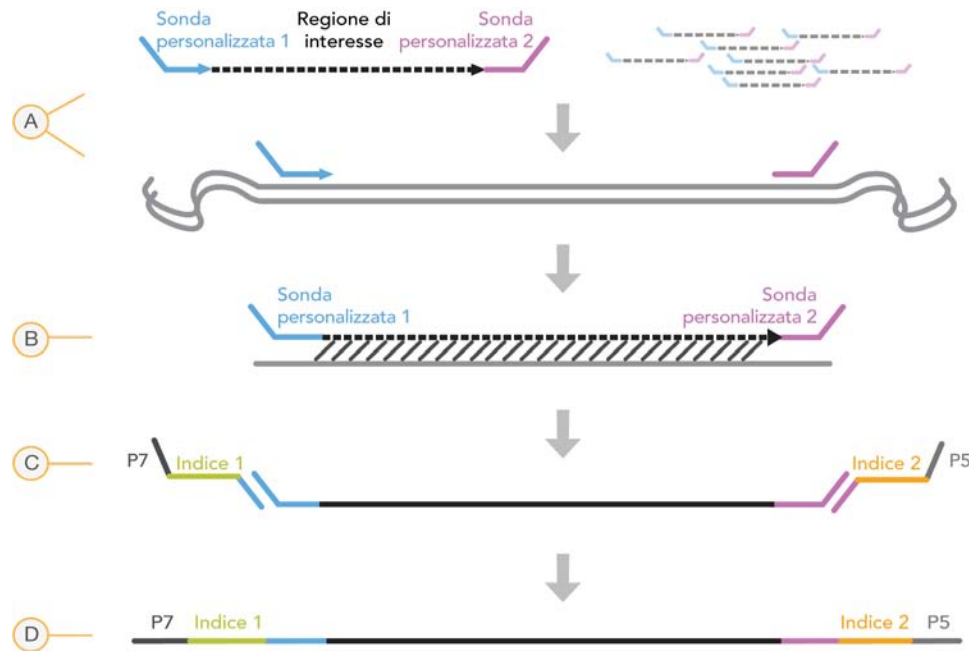
M1V	T338I	Q552X	3121-1G>A
CFTR dele2,3	1154insTC	**R553X**	3272-26A>G
Q39X	S341P	A559T	L1065P
E60X	R347H	**R560T**	R1066C
P67L	**R347P**	R560K	R1066H
R75X	R352Q	1811+1.6kb A>G	L1077P
G85E	1213delT	1812-1 G>A	W1089X
394delTT	1248+1G>A	E585X	Y1092X(C>A)
405+1 G>A	1259insA	**1898+1G>A**	Y1092X(C>G)
406-1G>A	W401X (c.1202G>A)	1898+3A>G	M1101K
E92X	W401X (c.1203G>A)	2143delT	E1104X
E92K	1341+1G>A	R709X	R1158X
Q98X	*PolyTG/PolyT*	K710X	**R1162X**
457TAT>G	1461ins4	2183delAA>G	**3659delC**
D110H	**A455E**	2184insA	S1196X
R117C	1525-1G>A	**2184delA**	W1204X (c.3611G>A)
R117H	S466X (C>A)	2307insA	W1204X (c.3612G>A)
Y122X	S466X (C>G)	L732X	3791delC
574delA	L467P	2347delG	**3849+10kbC>T**
621+1G>T	1548delG†	R764X	G1244E
663delT	S489X	2585delT	3876delA
G178R	S492F	E822X	S1251N
711+1G>T	Q493X	2622+1G>A	3905insT
711+3A>G	**I507del**	E831X	**W1282X**
711+5 G>A	**F508del**	W846X	4005+1G>A
712-1 G>T	1677delTA	R851X	**N1303K**
H199Y	V520F	2711delT	4016insT
P205S	Q525X†	**2789+5G>A**	Q1313X
L206W	1717-8G>A	Q890X	4209TGTT>AA
Q220X	**1717-1G>A**	L927P	CFTRdele22,23
852del22	**G542X**	S945L	4382delA
1078delT	S549R (c.1645A>C)	3007delG	*I506V*
G330X	S549R (c.1647T>G)	G970R	*I507V*
R334W	S549N	3120G>A	*F508C*
I336K	**G551D**	**3120+1G>A**	

† Classificato nel database CFTR2[12] come una variante che causa la fibrosi cistica, mentre Sosnay[13] classifica la variante come indeterminata. La classificazione in base al database è più attuale e riflette l'analisi funzionale completa, che non era disponibile al tempo della pubblicazione di Sosnay.

Principi della procedura

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina comporta due procedure principali. La prima consiste nel preparare manualmente i campioni per il sequenziamento, un'operazione detta preparazione della libreria. La preparazione della libreria consiste di quattro fasi principali: ibridazione, estensione-ligazione, amplificazione mediante PCR e normalizzazione della libreria. La seconda procedura consiste nel sequenziare il campione preparato mediante la chimica SBS (sequenziamento mediante sintesi) su MiSeqDx.

Preparazione della libreria



A **Ibridazione**: la prima fase consiste nell'ibridare un pool di oligonucleotidi a monte e a valle specifici per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant per il campione di DNA genomico. Al termine di questo processo, una procedura di lavaggio in tre fasi, con un filtro in grado di selezionare le dimensioni, rimuove gli oligonucleotidi non legati dal DNA genomico.

B **Estensione-ligazione**: la seconda fase collega gli oligonucleotidi a monte e a valle ibridati. Una DNA polimerasi si estende dagli oligonucleotidi a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti gli oligonucleotidi della fibrosi cistica specifici affiancati da sequenze necessarie per l'amplificazione.

C **Amplificazione mediante PCR**: la terza fase consiste nell'amplificazione dei prodotti dell'estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze di indici per il multiplex campioni, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione di cluster su MiSeqDx. Al termine di questo processo, una procedura di pulizia della PCR purifica i prodotti della PCR (indicati come libreria).

D **Normalizzazione della libreria**: la fase finale consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria onde garantire una rappresentazione più equilibrata nel pool finale di librerie. Al termine di questo processo, il pool di librerie viene caricato su MiSeqDx per il sequenziamento mediante la chimica SBS.

Sequenziamento

La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA crescenti. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, alla catena dell'acido nucleico viene aggiunto un solo deossinucleotide trifosfato (dNTP) marcato in fluorescenza. Il nucleotide

marcato funge da terminatore per la polimerizzazione, così dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging al fine di identificare la base e quindi sottoposto a scissione enzimatica per consentire l'incorporazione del nucleotide successivo. Poiché tutti e quattro i dNTP legati al terminatore reversibile (A, G, T, C) sono presenti come molecole singole e separate, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Le identificazioni delle basi vengono effettuate direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ogni ciclo di sequenziamento. Il risultato finale è un sequenziamento base per base.

Analisi dei dati

MiSeq Reporter elabora le identificazioni delle basi generate durante l'analisi primaria e produce informazioni su ciascun campione in base alle informazioni specificate nel foglio campioni, questa elaborazione si chiama analisi secondaria. L'analisi secondaria include de-multiplex, generazione di file FASTQ, allineamento, identificazione delle varianti e generazioni di file VCF che contengono le informazioni relative alle varianti del gene CFTR individuate in posizioni specifiche in un genoma di riferimento.

- **Demultiplex**: il de-multiplex costituisce la prima fase dell'analisi se nel foglio campioni sono elencati più campioni e la corsa presenta letture indici. Il demultiplex separa i dati da un pool di campioni in base agli indici sequenza univoci che sono stati aggiunti durante la fase di amplificazione mediante PCR.
- **Generazione di file FASTQ**: dopo il de-multiplex, MiSeq Reporter genera file intermedi in formato FASTQ, un formato di testo utilizzato per rappresentare le sequenze. I file FASTQ contengono le letture di ciascun campione e i punteggi qualitativi, con l'esclusione delle letture dei cluster che non hanno attraversato il filtro.
- **Allineamento**: mediante l'allineamento è possibile confrontare le sequenze rispetto a un riferimento al fine di identificare una relazione fra le sequenze e assegnare un punteggio in base a regioni di similarità. Le letture allineate sono scritte nei file in formato BAM. MiSeq Reporter utilizza un algoritmo di Smith-Waterman con matrice a banda che esegue allineamenti locali di sequenze per determinare il grado di similarità fra due sequenze.
- **Identificazioni delle varianti**: durante questa fase vengono registrate le varianti di singolo nucleotide (SNV), le inserzioni e delezioni (Indel) e altre varianti strutturali in un file di testo standardizzato chiamato MiSeqDxCF139VariantAssay.txt. Per maggiori informazioni, vedere la sezione File report dell'analisi nella *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15038356_ITA)*.

Limiti della procedura

1. Per uso diagnostico *in vitro*. I risultati ottenuti usando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina dovrebbero essere usati e interpretati nel contesto di una valutazione clinica completa.
2. Il saggio è progettato per identificare uno specifico sottogruppo di varianti note nel gene *CFTR*, ma non include tutte le varianti identificate nel gene *CFTR*. Quindi, se una variante non viene identificata non garantisce che altre varianti del gene *CFTR* non siano presenti nei campioni analizzati.
3. La frequenza delle varianti identificate mediante questo saggio varia fra le diverse popolazioni.
4. Come per qualsiasi saggio basato su ibridazione, i polimorfismi o le varianti latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono incidere sugli alleli sondati e, di conseguenza, sulle identificazioni effettuate.
5. Il saggio non può determinare se l'orientamento della variante PolyTG/PolyT si trova in cis/trans sulla variante R117H. Per i pazienti con una variante R117H, dovrebbero essere eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T], è in orientamento cis/trans sulla variante R117H.
6. PolyTG/PolyT sono regioni omopolimeriche note per essere difficili da interpretare con saggi basati sulle sequenze dovuti a scivolamento della polimerasi. È stata osservata una percentuale di identificazioni errata dello 0,9% (4/448) per i risultati PolyTG/PolyT dimostrando una discrepanza ±1 TG quando confrontato con il sequenziamento bidirezionale Sanger (Tabella 17).

Componenti del prodotto

La piattaforma MiSeqDx Illumina è composta da:

- saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant (N. di catalogo DX-102-1004 or DX-102-1003)
- Strumento MiSeqDx (N. di catalogo DX-410-1001)

Reagenti

Reagenti forniti

I reagenti per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina sono forniti da Illumina. Il n. catalogo DX-102-1003 è stato configurato per 20 corse con un massimo di 48 campioni per corsa (fino a 960 campioni totali). Il n. catalogo DX-102-1004 è stato configurato per due corse con un massimo di 48 campioni per corsa (fino a 96 campioni totali).

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, Scatola 1

Tabella 3 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant	10 provette	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene *CFTR*	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di ibridazione	10 provette	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Miscela di estensione-ligazione	10 provette	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice A (A501) - H (A508)	10 provette per primer	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701) -12 (A712)	10 provette per primer	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	10 provette	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	10 provette	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 4 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Diluente normalizzazione libreria	10 provette	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra -25 °C e -15 °C

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampone di diluizione libreria	10 provette	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Controllo interno PhiX	1 provetta	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, Scatola 2

Tabella 5 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Indice	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004		
Cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF 139-Variant	20 cartucce	2 cartucce	Cartuccia monouso che contiene i reagenti per la generazione di cluster e il sequenziamento da utilizzarsi con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanolo e DMSO < 2%.	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, Scatola 3

Tabella 6 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampone di lavaggio stringente	10 flaconi	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	10 provette	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 7 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Microsfere per la pulizia della PCR	10 provette	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	20 provette	2 provette	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere libreria	10 provette	1 provetta	1,2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF 139-Variant	20 contenitori	2 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, Scatola 4

Tabella 8 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Soluzione MiSeqDx SBS (PR2) - Saggio CF 139-Variant	20 flaconi	2 flaconi	353,1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, Scatola 5

Tabella 9 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Piastra filtro	20 piastre	2 piastre	N.D.	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana di polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 10 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità		Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Tampone di eluizione	10 provette	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione della libreria	10 provette	1 provetta	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e priva di RNasi

Reagenti post-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Etanolo, 200 proof (vol. 100%) per biologia molecolare
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e priva di RNasi

Conservazione e manipolazione

1. Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C.
2. I reagenti elencati di seguito sono spediti congelati e rimangono stabili se conservati a una temperatura fra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza specificata.
   - Pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant
   - Tampone di ibridazione
   - Miscela di estensione-ligazione
   - Primer indice A (A501) - H (A508)
   - Primer indice 1 (A701) -12 (A712)

- PCR polimerasi
- Master Mix per PCR
- Diluente normalizzazione libreria
- Tampone di diluizione libreria
- Controllo interno PhiX
- Cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF 139-Variant

A eccezione della cartuccia di reagenti, i reagenti rimangono stabili per un massimo di 6 cicli di congelamento/scongelamento effettuati prima della data di scadenza specificata.

Non ricongelare la cartuccia di reagenti una volta scongelata. Può essere conservata per un massimo di 6 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

3 I reagenti elencati di seguito sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura tra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza specifica.
   - Tampone di lavaggio stringente
   - Tampone di lavaggio universale
   - Microsfere per la pulizia della PCR
   - Microsfere libreria
   - Lavaggio di normalizzazione della libreria
   - Soluzione MiSeqDx SBS (PR2) - Saggio CF 139-Variant
   - Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF 139-Variant

4 I reagenti elencati di seguito sono spediti a temperatura ambiente e rimangono stabili se conservati a tale temperatura fino alla data di scadenza specificata.
   - Tampone di eluizione
   - Piastra filtro
   - Tampone di conservazione della libreria

5 Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti se si dovessero verificare tali cambiamenti (ad es. variazioni evidenti nel colore del reagente o opacità visibile con contaminazione microbica).

6 I reagenti del tampone di ibridazione, tampone di lavaggio stringente e diluente normalizzazione libreria potrebbero formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente, quindi ispezionare a occhio nudo per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.

7 Nella manipolazione delle microsfere per la pulizia della PCR e delle microsfere libreria attenersi alle migliori pratiche riportate di seguito:
   - Le microsfere non devono mai essere congelate.
   - Riportarle a temperatura ambiente.
   - Immediatamente prima dell'uso, agitarle bene finché sospensione e colore appaiono omogenei.
   - Dopo aver aggiunto le microsfere miscelare bene il campione pipettando su e giù dieci volte. Per miscelare il campione è possibile utilizzare un agitatore.
   - Incubare la miscela di microsfere/campione a temperatura ambiente per tutta la durata indicata.
   - Seguire le istruzioni per l'uso del supporto magnetico. attendere che la soluzione diventi trasparente prima di aspirare. Tenere la piastra sul supporto magnetico durante l'aspirazione lenta del surnatante, facendo attenzione a non toccare le microsfere separate.

8 La piastra di amplificazione mediante PCR può restare sul termociclatore per tutta la notte, oppure può essere conservata ad una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di due giorni. Prima di conservare la piastra a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C sigillarla bene.

9 Non congelare il reagente delle microsfere libreria o miscelarlo con il reagente del diluente normalizzazione libreria se non vengono utilizzati immediatamente.

10 La piastra completa di normalizzazione della libreria può essere conservata a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

11 La libreria di ampliconi raggruppati in pool può essere conservata tra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.
12 Caricare immediatamente nella cartuccia del reagente un pool di ampliconi diluiti appena preparati. Se conservato, il pool di ampliconi diluiti può comportare una riduzione significativa della densità dei cluster.

Apparecchiatura e materiali

Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

1 Strumento **MiSeqDx**, n. catalogo DX-410-1001
2 **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n. di catalogo FC-130-1005
3 **Kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar,** n. di catalogo FC-130-1007
4 **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

1 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra da 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
 - Intervallo di temperatura: ambiente +5 °C - 99 °C
 - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
2 **Incubatore di campioni**: è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
 - Intervallo di temperatura: 10 °C - 100 °C
 - Regolazione della temperatura: ± 0,2 °C
3 **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. (come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga). Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.
4 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. (come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set). L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette mono-canale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
5 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
 - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
   NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
 - Piastre di conservazione da 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
 - Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNAasi/RNAasi (vaschetta)
 - Sigillo adesivo in alluminio
 - Sigillo per piastre PCR appropriato
 - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

1 **Termociclatore**: è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - Intervallo di controllo della temperatura: tra 4 °C e 99 °C
 - Accuratezza del controllo: ± 0,25 °C da 35 °C a 99 °C
2 **Agitatore per micropiastre**: nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario un agitatore di micropiastre. L'agitatore di piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - Velocità massima di miscelazione: 3.000 rpm (giri/min)
 - Intervallo di velocità di miscelazione: 200 - 3.000 rpm (giri/min)

3 **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. (come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga). Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.
4 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   — Intervallo di temperatura: ambiente +5 °C - 99 °C
   — Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
5 **Supporto magnetico**: è necessario un supporto magnetico per una piastra da 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.
6 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. (come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set). L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette mono-canale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
7 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
   — Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
     NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
   — Piastre di conservazione da 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
   — Provette coniche, 15 ml
   — Provette per microcentrifuga Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)
   — Striscia a otto provette per PCR
   — Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNAasi/RNAasi (vaschetta)
   — Sigillo adesivo in alluminio
   — Sigillo adesivo per piastre
   — Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



NOTA
Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.

1 Possono essere utilizzati campioni di sangue intero prelevati in provette K_2 EDTA.
2 I campioni di sangue intero possono essere conservati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o fino a 30 giorni se congelati tra -25 °C e -15 °C.
3 I campioni di sangue intero possono essere trasportati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, o fino a 30 giorni se congelati fra -25 °C e -15 °C. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali, statali o locali per il trasporto di agenti eziologici.
4 Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni dei saggio allorché il DNA genomico è stato sottoposto a sei cicli di congelamento/scongelamento.
5 Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni del saggio in presenza di campioni di sangue intero con elevati tassi di bilirubina, colesterolo, trigliceride, EDTA o emoglobina.

Avvertenze e precauzioni



ATTENZIONE
La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico o di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita, ad usare o ad ordinare l'uso del dispositivo.

1 Alcuni componenti di questo saggio contengono formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 6. L'inalazione, l'ingestione, il

contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

2. Alcuni componenti di questo saggio contengono 2-mercaptoetanolo, un agente riducente. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 6. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata e smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
3. Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.
4. Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
5. Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle zone designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.
6. Non utilizzare i componenti del saggio oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione del saggio. Non scambiare i componenti di diversi lotti di saggi. I lotti di saggi sono identificati sull'etichetta della confezione del saggio.
7. Conservare i componenti del saggio alla temperatura indicata e in aree designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
8. Cicli ripetuti di congelamento-scongelamento (fino a 6) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del saggio.
9. Onde evitare il degrado del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori di sodio ipoclorito si siano dissipati completamente prima di iniziare il protocollo.
10. È necessario adottare idonee pratiche di laboratorio e una valida igiene per impedire la contaminazione di reagenti, strumenti e campioni di DNA genomico con i prodotti della PCR. La contaminazione da PCR può produrre risultati inesatti e inaffidabili.
11. Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione siano dotate delle apposite attrezzature (ad es., pipette, punte di pipette, agitatori e centrifughe).
12. Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte di pipette nuove fra un campione e l'altro e fra le erogazioni di reagenti. Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato. Non agitare le piastre. L'utilizzo di punte dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.
13. Le combinazioni indice-campione devono corrispondere esattamente a quelle del foglio campioni. La non corrispondenza fra il foglio campioni e il layout della piastra risulterà in una perdita di identificazione dei campioni positivi e nella refertazione di risultati errati.
14. Preparare sempre al momento l'etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
15. Assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti durante le fasi di lavaggio. L'etanolo residuo può influire sui risultati.
16. Rispettare il tempo di asciugatura indicato dopo la fase del supporto magnetico al fine di garantire che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
17. Non mescolare il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant e il tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant diventa instabile, anche se conservato congelato.
18. L'utilizzo di termociclatori a raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente) non è consigliato per la fase di ibridazione. La fase di raffreddamento passivo è cruciale per un'adeguata ibridazione.
19. Aggiungere sempre PCR polimerasi al Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro combinata.

20 Durante la fase di normalizzazione della libreria, è estremamente importante risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso MiSeqDx.
21 Rispettare i tempi di incubazione specificati per la fase di normalizzazione della libreria. Un'incubazione inadeguata può influire sulla rappresentazione della libreria e sulla densità dei cluster.
22 A causa del numero di trasferimenti della piastra e della conseguente potenziale contaminazione, è importante fare molta attenzione per assicurare che il contenuto dei pozzetti rimanga totalmente al loro interno. Non far schizzare il contenuto.
23 L'input di DNA di 250 ng raccomandato permette la variazione della quantità del DNA; le prestazioni del saggio si basano su questo livello di input.
24 Le varianti del campione indicate come No call (Nessuna identificazione) sul report del test indica che i dati per quella posizione della variante non corrisponde alle soglie di sequenziamento. Le varianti indicate come No call (Nessuna identificazione) non devono essere riportate a meno che il test ripetuto fornisca valori che corrispondono alle soglie definite e non siano più indicate come No call (Nessuna identificazione).

Note sulle procedure

1 Illumina ritiene necessario che per ogni corsa, definita come una serie di campioni elaborati in parallelo, vengano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un controllo negativo (NTC o No Template Control, controllo senza templato). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una o più mutazioni note del gene *CFTR*. Illumina raccomanda di usare un controllo wild type. Il controllo wild type deve essere eseguito come un campione e non deve sostituire il controllo positivo o negativo.
2 Prima di iniziare il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant, estrarre e quantificare il DNA.
3 È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione del DNA approvato.
4 Quantificare il DNA con uno spettrofotometro. Verificare che il rapporto A260/A280 del campione di DNA sia > 1,5. Normalizzare il campione di DNA a 50 ng/µl. Per ciascun campione sono necessari 5 µl di DNA genomico (250 ng totali).

Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina, il rendimento dei campioni per corsa di MiSeqDx può essere tra 8 e 48 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza dell'indice.



NOTA
Per la massima efficienza di rendimento, eseguire la preparazione della libreria per un massimo di 96 campioni e quindi dividere i campioni in due corse di sequenziamento con un massimo di 48 campioni ciascuno.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni ciclo deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ogni canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ogni base dell'indice letta sottoposta a sequenziamento, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento della Lettura indici.

Per scegliere le combinazioni di primer indice per corse a 48 o 96 campioni, vedere la Tabella 11.

Tabella 11 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 48 campioni o 96 campioni

Righe A-H	Colonne 1-6	Colonne 7-12
Primer indice A (A501)	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 6 (A706)
Primer indice B (A502)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 7 (A707)
Primer indice C (A503)	Primer indice 3 (A703)	Primer indice 8 (A708)

Righe A-H	Colonne 1-6	Colonne 7-12
Primer indice D (A504)	Primer indice 4 (A704)	Primer indice 9 (A709)
Primer indice E (A505)	Primer indice 5 (A705)	Primer indice 11 (A711)
Primer indice F (A506)	Primer indice 10 (A710)	Primer indice 12 (A712)
Primer indice G (A507)	--	--
Primer indice H (A508)	--	--

Se si sequenziano meno di 48 campioni in una corsa di sequenziamento, selezionare gli indici appropriati in base alle relative sequenze per conservare il bilanciamento cromatico nei canali verde e rosso. Vedere la Tabella 13 e la Tabella 14. Come requisito minimo, le corse con 8 o 48 campioni devono includere una combinazione di primer di indicizzazione identificata nella Tabella 12.

Per elaborare in maniera accurata corse più piccole, devono essere presenti almeno otto campioni. Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati o qualsiasi campione di DNA genomico umano. Per il set minimo di indici bilanciati per colore da usare nelle corse di sequenziamento a 8 campioni, vedere la Tabella 12.

Tabella 12 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 10 (A710)
Primer indice C (A503)	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Primer indice D (A504)	Campione 4	Campione 5	Campione 6
Primer indice E (A505)	Campione 7	Campione 8	--

Sequenze dei primer indice

Tabella 13 Sequenze per Primer indice A (A501) - H (A508)

Primer indice	Sequenza
Primer indice A (A501)	TGAACCTT
Primer indice B (A502)	TGCTAAGT
Primer indice C (A503)	TGTTCTCT
Primer indice D (A504)	TAAGACAC
Primer indice E (A505)	CTAATCGA
Primer indice F (A506)	CTAGAACA
Primer indice G (A507)	TAAGTTCC
Primer indice H (A508)	TAGACCTA

Tabella 14 Sequenze per Primer indice 1 (A701) -12 (A712)

Primer indice	Sequenza
Primer indice 1 (A701)	ATCACGAC
Primer indice 2 (A702)	ACAGTGGT
Primer indice 3 (A703)	CAGATCCA

Primer indice	Sequenza
Primer indice 4 (A704)	ACAAACGG
Primer indice 5 (A705)	ACCCAGCA
Primer indice 6 (A706)	AACCCCTC
Primer indice 7 (A707)	CCCAACCT
Primer indice 8 (A708)	CACCACAC
Primer indice 9 (A709)	GAAACCCA
Primer indice 10 (A710)	TGTGACCA
Primer indice 11 (A711)	AGGGTCAA
Primer indice 12 (A712)	AGGAGTGG

Istruzioni per l'uso

Preparazione del foglio campioni per MiSeqDx

1. Nella schermata Welcome (Benvenuto) di Worklist Manager Illumina, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro).
2. Nel campo Test Type (Tipo di test), selezionare **CF 139-Variant Assay** (Saggio CF 139-Variant).
3. Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere il nome per il foglio campioni.
   - Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, il software operativo MiSeq (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni.
   - Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) nel software operativo MiSeq (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
4. [Opzionale] Immettere una descrizione per identificare la corsa.
5. Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa.
6. Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento informazioni sui campioni

1. Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ciascun pozzetto contenente campione:
   a. **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco.
   b. **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore dell'indice che verrà utilizzato per ogni Lettura indici.
2. [Opzionale] Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.
3. [Opzionale] Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).
4. Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.
5. Selezionare **Finish** (Fine).

Ibridazione del pool di oligonucleotidi

Preparazione

1. Portare a temperatura ambiente il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomici e il campione di controllo positivo.
2. Inserire in un agitatore il pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant e il tampone di ibridazione e agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.
3. Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.
4. Preriscaldare un incubatore a 37 °C.
5. Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da IWM.

Procedura

1. Impostare una nuova piastra PCR con 96 pozzetti (si seguito definita piastra **HYB**).
2. Aggiungere 5 µl di campione o controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) ai pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.
3. Aggiungere 5 µl del pool di oligonucleotidi per il saggio CF 139-Variant a tutti i pozzetti contenenti il DNA genomico.
4. Aggiungere 40 µl di tampone di ibridazione a ogni campione nella piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3–5 volte per miscelare.
5. Sigillare la piastra **HYB** e centrifugare 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
6. Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.
7. Ridurre la temperatura del blocco termico a 40 °C e continuare a incubare fino a quando il blocco di calore raggiunge 40 °C (circa 80 minuti).
   Il raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).



PUNTO DI ARRESTO SICURO
Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per 2 ore.

Rimozione degli oligonucleotidi non legati

Preparazione

1. Portare la miscela di estensione-ligazione, il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale a temperatura ambiente e agitare brevemente.
2. Assemblare l'unità piastra filtro (d'ora in avanti denominata **FPU**) nell'ordine dall'alto verso il basso: coperchio, piastra filtro, colletto adattatore e piastra MIDI.
3. Pre-lavare la membrana della piastra filtro come segue:
   a. Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
   b. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

Procedura

1. Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2. Trasferire tutto il volume di ciascun campione (circa 55 µl) nei corrispondenti pozzetti della piastra filtro.
3. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
4. Lavare la piastra filtro come segue:
   a. Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
5. Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.


NOTA
Se il tampone di lavaggio non asciuga completamente, centrifugare di nuovo a 2.400 x g a 20 °C finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

6 Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide), quindi riassemblare l'**FPU**.
7 Dispensare 45 µ di tampone di lavaggio universale in ciascun pozzetto contenente il campione.
8 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 10 minuti.


NOTA
Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Ripetere la centrifugazione se necessario.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Procedura

1 Aggiungere 45 µl di miscela di estensione-ligazione a ogni pozzetto di campione della piastra filtro.
2 Sigillare la piastra filtro con foglio di allumino adesivo e quindi coprire il coperchio.
3 Incubare l'unità **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.

Amplificazione mediante PCR

Preparazione

1 Preparare 0,05 N di NaOH freschi.
2 Determinare i primer indice da utilizzare base alla stampa dello schema della piastra da Worklist Manager Illumina.
3 Portare il Master Mix per PCR e i primer indice appropriati a temperatura ambiente. Agitare ogni provetta scongelata per miscelare e quindi centrifugare brevemente le provette.
4 Impostare una nuova piastra PCR con 96 pozzetti (di seguito definita piastra **AMP**).
5 Aggiungere i primer indice alla piastra AMP come segue:
   a Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati [A (A501) – H (A508)] nel pozzetto appropriato in una colonna della piastra **AMP**.
   b Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.
   c Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati [1 (A701) – 12 (A712)] nella riga appropriata della piastra **AMP**. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.***
   d Smaltire i tappi arancioni originali e applicare tappi arancioni nuovi.
6 Preparare una soluzione di lavoro per la PCR Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
   a Per 96 campioni, aggiungere 56 µl di PCR polimerasi a 2,8 ml di Master Mix per PCR.
   b Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro per la PCR preparata per miscelarla.

   La soluzione di lavoro per la PCR si mantiene stabile a temperatura ambiente per 10 minuti.

Procedura

1 Rimuovere l'**FPU** dall'incubatore e rimuovere il sigillo in alluminio.
2 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 2 minuti.
3 Aggiungere 25 µl di 0,05 N di NaOH a ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Pipettare NaOH su e giù 5-6 volte.
4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.
5 Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire 22 µl della soluzione di lavoro per PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice.
6 Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP come segue:
   a Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
   b Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.

c Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per PCR.

d Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra AMP in modo simile. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.***

7 Sigillare la piastra **AMP** e assicurare con un rullo di gomma.
8 Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
9 Trasferire la piastra AMP sull'area di post-amplificazione.
10 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
- 95 °C per 3 minuti
- 25 cicli di:
  - 95 °C per 30 secondi
  - 62 °C per 30 secondi
  - 72 °C per 60 secondi
- 72 °C per 5 minuti
- Mantenere a 10 °C



PUNTO DI ARRESTO SICURO
Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra **AMP** può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per massimo 48 ore.

Pulizia della PCR

Preparazione

1 Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
2 Preparare etanolo all'80% fresco dall'etanolo assoluto.

Procedura

1 Centrifugare la piastra AMP a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2 Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **CLP**).
3 Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente e quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.
4 Aggiungere 45 µl di microsfere per la pulizia della PCR a ogni pozzetto di campione della piastra **CLP**.
5 Trasferire l'intero prodotto per PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**.
6 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.
7 Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
8 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è scomparso.
9 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
10 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere come segue:
  a Dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ogni pozzetto contenente il campione.
  b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
  c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
11 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.
12 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.
13 Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
14 Dispensare 30 µ di tampone di eluizione in ciascun campione e agitare brevemente.
15 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti. Dopo l'agitazione, controllare che i campioni siano risospesi. Altrimenti, ripetere questo passaggio.
16 Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.

17 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
18 Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **LNP**).
19 Trasferire 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**.
20 [Opzionale] Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** a una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti per PCR puliti possono essere usati per scopi di ricerca ed eliminazione guasti in caso di problemi a carico dei campioni.



PUNTO DI ARRESTO SICURO
Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto. La piastra è stabile per un massimo di 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione della libreria

Preparazione

1 Preparare 0,1 N di NaOH freschi.
2 Portare il diluente normalizzazione libreria, le microsfere libreria e il Lavaggio di normalizzazione della libreria a temperatura ambiente.
3 Agitare il diluente normalizzazione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
4 Agitare le microsfere libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

1 Miscelare il diluente normalizzazione libreria e le microsfere libreria in una provetta conica fresca da 15 ml come segue:



NOTA
Se si stanno analizzando meno di 24 campioni, utilizzare una provetta nuova da 1,5 ml.

a Per 96 campioni, dispensare 4,4 ml di diluente normalizzazione libreria.
b Pipettare le microsfere libreria su e giù 10 volte per risospendere.



NOTA
È fondamentale risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso.

c Per 96 campioni, pipettare 800 µl di microsfere libreria nella provetta contenente il diluente normalizzazione libreria.
d Miscelare capovolgendo la provetta 15-20 volte.

2 Dispensare 45 µl della soluzione di lavoro di diluente normalizzazione libreria/microsfere libreria combinata in ogni pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie.
3 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.
4 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è scomparso.
5 Con la piastra **LNP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
6 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria come segue:
a Dispensare 45 µ di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
b Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.

- c Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
- d Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.

7 Ripetere la procedura di lavaggio di normalizzazione della libreria come descritto nella fase precedente.
8 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.
9 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto.
10 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
11 Durante l'eluizione di 5 minuti, impostare una nuova piastra PCR con 96 pozzetti (di seguito definita piastra **SGP**).
12 Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria a ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.
13 Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospendere le microsfere, quindi agitare per altri 5 minuti.
14 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
15 Trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.
16 Sigillare la piastra **SGP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.



PUNTO DI ARRESTO SICURO
Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

Creazione di pool di librerie

Preparazione del pool di librerie

1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
2 In un portaghiaccio, preparare un bagno di acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno di acqua e ghiaccio.
3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx.

Preparazione di una soluzione di diluizione fresca di NaOH



ATTENZIONE
L'utilizzo di una soluzione di diluizione fresca di NaOH è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione di cluster sul dispositivo MiSeqDx.

1 Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga:
- Acqua da laboratorio (900 µl)
- 1,0 N di NaOH (100 µl)

2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.

Denaturazione e diluizione del controllo interno PhiX

1 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del controllo interno PhiX a 2 nM:
- Libreria del controllo interno PhiX da 10 nM (2 µl)
- 1X tampone TE (8 µl)

2 Combinare i seguenti volumi per ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 1 nM:
- Libreria del controllo interno PhiX da 2 nM (10 µl)
- 0,1 N NaOH (10 µl)

3 Inserire brevemente in un agitatore per miscelare la soluzione della libreria del controllo interno PhiX da 1 nM.

4 Centrifugare la soluzione di templato a 280 x g a 20 °C per 1 minuto.
5 Incubare per 4,5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la libreria del controllo interno PhiX in filamenti singoli.
6 Aggiungere il seguente volume di tampone di diluizione libreria pre-raffreddato nella provetta contenente la libreria del controllo interno PhiX denaturata per ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 20 pM.
  — Libreria del controllo interno PhiX denaturata (20 µl)
  — Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (980 µl)

Preparazione della cartuccia di reagenti

1 Scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF 139-Variant in un bagnomaria contenente abbastanza acqua deionizzata a temperatura ambiente così da immergere la base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.
2 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare a bagnomaria a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a completo scongelamento.
3 Rimuovere la cartuccia dal bagnomaria e batterla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati e poi ispezionare visivamente tutti i serbatoi per accertarsi che siano scongelati.



NOTA
È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

2 Ispezionare visivamente il reagente nella posizione 1 per accertarsi che sia ben miscelato e privo di precipitati.
3 Battere delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.



NOTA
I tubi dei pescanti del MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle.

4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a 6 ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

1 Portare il tampone di diluizione libreria a temperatura ambiente. Agitare il tampone di diluizione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelarla fino a raggiungere la temperatura ambiente.
3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
4 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **PAL**).
5 Determinare i campioni da raggruppare in pool per il sequenziamento. Per il sequenziamento è possibile utilizzare al massimo 48 campioni contemporaneamente.
6 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, mescolare ciascuna libreria da sequenziare pipettando su e giù per 3-5 volte.
7 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP**, colonna per colonna, a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.



NOTA
Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP** fra -25 °C e -15 °C. La piastra **SGP** sigillata rimane stabile per un massimo di 3 giorni.

8 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL**.
9 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **DAL**).
10 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione libreria nella provetta **DAL**.
11 Dispensare 6 µl di controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
12 Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente tampone di diluizione libreria. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
13 Mescolare la **DAL** agitando la provetta molto velocemente.
14 Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
15 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per 2 minuti.
16 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno di acqua e ghiaccio.
17 Tenere la provetta **DAL** nel bagno di acqua e ghiaccio per 5 minuti.

Caricamento delle librerie di campioni nella cartuccia

1 Utilizzare la punta di una pipetta pulita e vuota da 1 ml per forare la capsula di alluminio che sigilla il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni).
2 Pipettare 600 µl delle librerie di campioni nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni). Fare attenzione a evitare di toccare la capsula sigillante durante l'erogazione del campione.
Una volta caricato il campione, verificare la presenza di bolle d'aria nel serbatoio. In caso di presenza di bolle d'aria, picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco in modo da farle fuoriuscire.
3 Passare direttamente alla procedura di impostazione della corsa usando l'interfaccia del software operativo MiSeq (MOS).

Interpretazione dei risultati

1 Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è progettato per rilevare le 139 varianti del gene CFTR, incluse quelle raccomandate dall'ACMG (Tabella 2).
2 Il report del saggio elenca i nomi dei campioni e il genotipo per ciascuna variante rilevata per un campione.
— Tutti i campioni sono interrogati per le 134 varianti che causano la fibrosi cistica e la variante R117H raccomandata dall'ACMG; nel report del saggio sono elencati solo gli alleli mutanti rilevati.
— La variante PolyTG/PolyT viene riportata solo se la variante R117H viene identificata per un campione. Per i pazienti con una variante R117H, vengono eseguiti ulteriori test per determinare se una variante PolyTG/PolyT, che può incidere sul fenotipo clinico [ad. es., 12-13 (TG) o 5T] è in orientamento cis/trans sulla variante R117H.



NOTA
Il genotipo PolyTG/PolyT viene determinato dal saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant in base al conteggio delle letture del genotipo più comune. Grazie alla natura digitale del sequenziamento di nuova generazione, il saggio è in grado di raggiungere accuratezza elevata mediante osservazioni multiple rispetto a tecnologie basate sul sequenziamento che usano solo poche osservazioni.

— Quando un campione presenta il genotipo omozigote F508del o I507del, se sono rilevati uno o più dei tre polimorfismi benigni I506V, I507V e F508C, questo viene riportato per il campione. Se tutti e tre i polimorfismi sono wild type, il report indica che le varianti I506V, I507V e F508C non sono presenti per il campione.



NOTA
Poiché questo è un saggio basato sul sequenziamento, non ci sono interferenze nel riportare F508del o I507del dovute ai tre polimorfismi benigni. Quindi, non verranno eseguite correzioni sul risultato rilevato.

- Il risultato del genotipo è riportato come HET quando un campione è identificato come eterozigote e per il campione sono stati rilevati sia wild type che alleli mutanti.
- Il risultato del genotipo è riportato come HOM quando un campione è identificato come omozigote e per il campione è rilevato solo l'allele mutante.
- Se per un campione non viene identificata alcuna variante, il report indica No panel variants are detected (Non è stata rilevata alcuna variante per il pannello).

3. Il report del saggio fornisce informazioni sulla percentuale di identificazione del campione per ciascun campione. La percentuale di identificazione è calcolata come il numero di posizioni/regioni della variante che corrisponde a un valore di soglia di affidabilità predefinito per il numero totale di posizioni/regioni interrogate.
   - Per i campioni che richiedono report condizionale, anche le varianti aggiuntive interrogate sono usate per il calcolo della percentuale di identificazione.
   - Qualsiasi variante con un valore di affidabilità predefinito inferiore alla soglia viene riportato come No call (Nessuna identificazione). Si raccomanda di ripetere il campione.
4. Il risultato ottenuto viene considerato valido solo se la percentuale di identificazione è ≥ 99%. Se la percentuale di identificazione è inferiore a 99%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il campione deve essere ripetuto.
   NOTA: se la percentuale di identificazione del campione è < 50%, la prestazione verrà riportata come Fail (Non superato) e il commento Sample Failed (Campione non superato) verrà indicato nel report. Non verranno visualizzate informazioni sulla variante. Questo campione deve essere ripetuto.
5. Si raccomanda all'utente di verificare le varianti convalidate usando campioni sintetici (vedere la tabella Accuratezza) usando un metodo di riferimento convalidato prima di riportare il primo risultato del paziente con quelle varianti.
6. Se per un campione vengono identificate più di due varianti, si raccomanda di verificare il risultato ripetendo il campione usando il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina con gDNA estratto fresco per escludere la contaminazione incrociata del campione.
   NOTA: quando vengono rilevate due o più varianti deve essere presa in considerazione la determinazione delle fasi (phasing) per l'aplotipo.
7. Tutte le interpretazioni delle varianti devono essere eseguite da un genetista molecolare certificato o equivalente attendendosi alle procedure linee guida locali[15]. I riferimenti potenziali per l'interpretazione includono, ma non sono limitati a: database CFTR2[11], classificazione di Sosnay[13], linee guida 2004 dell'ACMG[1] e opinione 2011 della commissione ACOG[2].

Per informazioni su come vengono calcolati e presentati i risultati o per una descrizione del contenuto nel report dei file di testo, vedere la *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15038356_ITA)*.

Procedure per il controllo qualità

Le buone pratiche di laboratorio impongono che i materiali di controllo siano valutati per rilevare le differenze nell'elaborazione dei campioni e nelle procedure tecniche nel laboratorio dell'utente che potrebbero produrre una variabilità significativa nei risultati.

1. **Controlli positivi**: un campione di DNA di controllo positivo è richiesto su ciascuna corsa. Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con almeno una variante del gene CFTR.[16] Illumina raccomanda di usare i controlli positivi in rotazione coerenti con le linee guida e gli standard tecnici 2008 dell'ACMG per l'analisi delle mutazioni della fibrosi cistica[17] e gli standard di laboratorio 2013 dell'ACMG per il sequenziamento di nuova generazione.[18] I campioni di controllo positivi devono generare il genotipo previsto. Se il controllo positivo genera un genotipo diverso da quello previsto

significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a cominciare dalla preparazione delle librerie.

2 **Controllo negativo (nessun templato/nessun DNA)**: l'uso di un controllo negativo (nessun templato/nessun DNA) è richiesto su ciascuna corsa per rilevare possibili incidenze di contaminazione. La percentuale di identificazioni per il controllo positivo deve essere di almeno il 10%. Se un controllo negativo genera una percentuale di identificazioni di > 10%, potrebbe quindi essersi verificata una contaminazione durante l'elaborazione del saggio. Il saggio viene considerato non riuscito e deve essere ripetuto completamente, a cominciare dalla preparazione delle librerie.

3 **Controllo wild type**: il campione di DNA di controllo è raccomandato su ciascuna corsa. Il campione di controllo wild type deve essere un campione ben caratterizzato che non contiene nessuna variante del gene CFTR. Il campione di controllo positivo deve generare il genotipo previsto. Se il controllo wild type genera un genotipo diverso da quello previsto significa che si è verificato un errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il saggio deve essere ripetuto completamente a cominciare dalla preparazione delle librerie.

4 Prima di iniziare a usare questo prodotto nel laboratorio dell'utente, le prestazioni del saggio devono essere verificate testando un numero di campioni positivi e negativi con caratteristiche delle prestazioni note.

5 Tutti i requisiti di controllo della qualità devono essere eseguiti in conformità alle regolamentazioni locali, statali e/o e ai requisiti di certificazione.

Caratteristiche prestazionali

Accuratezza

L'accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è stata stimata valutando 500 campioni che rappresentano una vasta gamma di varianti del gene CFTR da quattro fonti separate. La fonte principale dei dati di accuratezza è stato uno studio di accuratezza clinica condotto usando un pannello di 366 campioni. La maggior parte (n = 355) dei campioni consisteva di campioni clinici di gDNA archiviati, anonimizzati e isolati da sangue umano, i restanti 11 campioni sono stati ottenuti da campioni di linee cellulari disponibili in commercio.

I dati di questo studio sono stati integrati con i dati di accuratezza ottenuti da 68 campioni di linee cellulari nello studio di riproducibilità, 14 campioni clinici ottenuti dallo studio di valutazione analitica del metodo di estrazione e 52 campioni di plasmidi sintetici. I plasmidi sintetici sono stati progettati per includere il contesto genomico di varianti rare e contenuti ovunque da una a nove varianti entro lo stesso costrutto. Sono stati linearizzati, diluiti a numero di copie equivalenti di DNA genomico e miscelati con campioni di DNA genomico umano di genotipo wild type a numero di copie equivalenti per imitare un campione eterozigote.

I risultati di genotipizzazione per 137 siti di SNV/piccoli Indel, inclusa la regione PolyTG/PolyT, sono stati confrontati con l'analisi bidirezionale delle sequenze di Sanger. Sono stati usati due saggi convalidati basati sulla PCR come metodo di riferimento per due ampie delezioni nel pannello. Ciascun saggio di duplex PCR ha utilizzato due gruppi di primer per discriminare tra genotipi wild type, eterozigote e omozigote. Uno dei gruppi di primer è stato progettato per affiancare i punti di rottura delle delezioni, mentre l'altro gruppo ha amplificato una regione interna alla delezione. I due prodotti sono stati rilevati mediante separazione in base alla dimensione su un gel di agarosio.

I saggi PCR sono stati convalidati usando un pannello di 28 campioni in tutto (22 campioni per ciascuna delezione) che consiste di campioni di DNA genomico di linee cellulari e derivati dal sangue e plasmidi sintetici, che hanno incluso i genotipi WT, HET e HOM per ciascuna ampia delezione. È stato confermato che i saggi PCR presentano una specificità e una riproducibilità del 100% per tutti i campioni testati, mediante la valutazione dei prodotti della PCR su un gel di agarosio. L'accuratezza dei saggi PCR è stata confermata usando il sequenziamento Sanger ed è stata del 100% per tutti i campioni.

L'accuratezza è stata determinata per ogni genotipo attraverso tre misurazione statistiche. La concordanza positiva è stata calcolata per ciascun genotipo di variante dividendo il numero di campioni con identificazioni di varianti concordanti per il numero totale di campioni con detta variante come identificata dai metodi di riferimento. La concordanza negativa è stata calcolata su tutte le posizioni wild type (WT) dividendo il numero di posizioni WT concordanti per il numero di posizioni WT come definiti dai metodi di riferimento. La concordanza complessiva (OA) è stata calcolata su tutte le posizioni riportate dividendo il numero di posizioni di WT e delle varianti concordanti per il numero di posizioni riportate come determinate dai metodi di riferimento.

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina presenta una concordanza positiva (PA) a livello di genotipo del 100%. La concordanza negativa (NA) per tutte le posizioni WT era > 99,99% e la concordanza complessiva (OA) per tutte le posizioni riportate era > 99,99%. Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali.

Tabella 15 Accuratezza complessiva del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C>T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G>A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G>A	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G>C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C>T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G>A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G>T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
G178R	SNV	c.532G>A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G>T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C>T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T>G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G>T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C>T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G>A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G>A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C>A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X (C>G)	SNV	c.1397C>G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C>T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G>T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G>A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G>A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T>G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G>A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G>A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G>A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_ 2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2 053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A>T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_21 76insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C>T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C>T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G>A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G>A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
3272-26A>G	SNV	c.3140-26A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C>T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G>A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	SNV	c.3276C>A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C>T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C>G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G>A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
3905insT	DIV	c.3773_3774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
W1282X	SNV	c.3846G>A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C>G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23§	DEL	c.3964-78_ 4242+577del	500	1	0	1	498	1§	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327 delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
712-1 G>T	SNV	c.580-1G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
S466X (C>A)	SNV	c.1397C>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T>G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
E822X	SNV	c.2464G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A	SNV	c.2490+1G>T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T>C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1077P^	SNV	c.3230T>C	500	0	0	1	499	0^	0	100	100	100
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (Nome comune)	Tipo di variante	Nome cDNA	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
				Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C>T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_ 4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT[€]	PolyTGPolyT	c.1210-12T [5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N.D.	100
I506V[¥]	SNV	c.1516A>G	1	0	0	0	1	0	0	N.D.	100	100
I507V[¥]	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N.D.	100	100
F508C[¥]	SNV	c.1523T>G	1	0	0	0	1	0	0	N.D.	100	100
totali			67522		557		66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (variante delezione/inserzione).

* Il report Sanger indicava la variante P205S come eterozigote per il campione clinico. Una revisione dei dati ottenuti dalla traccia Sanger indicava tuttavia che la variante era in effetti omozigote e riportata correttamente. MiSeqDx ha riportato la variante come omozigote.

§ Un campione eterozigote sintetico per l'esone 8 è stato riportato come eterozigote per la variante dele22, 23 del gene CFTR. Ulteriori indagini hanno rilevato che questo risultato proveniva da un livello di contaminazione ridotto.
^ È stato determinato che il campione eterozigote sintetico originale era stato preparato impropriamente. Quando è stato analizzato successivamente dopo essere stato preparato usando lo stesso plasmide è stato rilevato.
€ Quando R117H è positivo, la variante PolyTG/PolyT viene ulteriormente riportata.
¥ Nel caso di una variante F508del omozigote, tre ulteriori basi wild type (ad es., varianti I506V, I507V, F508C) che non sono state identificate nel campione sono state ulteriormente riportate.

Tabella 16 Accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant per I506V, I507V e F508C.

Variante (Nome comune)	Identificazioni totali per variante	Identificazioni positive (varianti)			Identificazioni negative wild type	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
		Campioni clinici	Campioni linee cellulari	Campioni sintetici						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabella 17 Accuratezza del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant per le varianti PolyTG/PolyT

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100

Genotipo PolyTGPolyT	N. di campioni clinici	N. di campioni linee cellulari	N. di campioni sintetici	N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite*	% accuratezza
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Totale**	448			4	3	98,44

* I campioni non sono stati analizzati nuovamente.
^ Uno dei risultati discordanti provenivano dallo studio di riproducibilità. Il risultato PolyTG/PolyT per il campione era concordante su tutti i 18 replicati, ma discordante con il sequenziamento bidirezionale Sanger.

** Il conteggio totale dei campioni per la variante PolyTG/PolyT è 448 perché tutti i campioni sintetici (n = 52) sono stati creati mescolando plasmidi linearizzati con uno o due campioni della linea cellulare. Poiché riportando la variante PolyTG/PolyT per questi campioni sintetici aggiuntivi la variante verrebbe riportata eccessivamente, i campioni sintetici sono stati esclusi da questa analisi.

Riproducibilità

La riproducibilità del sistema per fibrosi cistica MiSeqDx è stata determinata mediante uno studio condotto in cieco in tre centri di sperimentazione con due operatori per ciascun centro. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun centro per un totale di 810 identificazioni per centro. I panelli erano costituiti da una miscela di DNA genomico proveniente da linee cellulari linfoblastoidi con varianti note nel gene *CFTR*, oltre che da sangue deleucocitato con aggiunta di linee cellulari linfoblastoidi con varianti note nel gene *CFTR*. I campioni di sangue servivano per consentire l'incorporazione delle fasi di estrazione necessarie per preparare il gDNA utilizzato come input primario per il flusso di lavoro del saggio.

La percentuale dei campioni "pass", vale a dire il numero di campioni che hanno superato la metrica QC al primo tentativo, è stato del 99,9%.

La concordanza positiva a livello di genotipo per tutte le varianti era del 99,77%. La concordanza negativa per tutte le posizioni wild type era del 99,88% e la concordanza complessiva per tutte le posizioni riportate era del 99,88%. Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali. Per lo studio di riproducibilità non sono stati ripetuti test.

Tabella 18 Riproducibilità del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	9**	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C non presente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72§	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1§	100	99,96	99,96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75^	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135^	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10 (T)9/ (TG)12 (T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86[§]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1[§]	100	99,96	99,96
B	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
totali				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

* La posizione del wild type corrispondente alla variante N1303K per un replicato ha prodotto una mancata identificazione a causa della copertura insufficiente.
^ Un replicato dei campioni 5 e 75 ha registrato una percentuale di identificazione dello 0%. Ulteriore investigazione indica che i campioni potrebbero non essere stati aggiunti alla piastra campioni prima della preparazione della libreria perché i volumi dei campioni rimanenti nelle provette erano coerenti con nessun volume rimosso.
** Evidenze empiriche indicano che probabilmente i campioni 9 e 10 sono stati scambiati dall'operatore prima della preparazione della libreria.
§ La posizione del wild type corrispondente alla variante M1V per un replicato di ciascuno dei due campioni ha prodotto una mancata identificazione a causa della copertura insufficiente.

Tabella 19 Informazioni aggiuntive sulle varianti dello studio di riproducibilità

Variazione (Nome comune)	Tipo di variante	Regione gene CFTR
PolyTG/PolyT	DIV* composto	Introne 9
2183AA>G	DIV* composto	Esone 14
CFTR dele2, 3	DEL	Introne1-Introne3
1154insTC	DIV*	Esone 8
I507del	DIV*	Esone 11
F508del	DIV*	Esone 11
2143delT	DIV*	Esone 14
3659delC	DIV*	Esone 22
3876delA	DIV*	Esone 23
394delTT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 3
1078delT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 8
2184delA	DIV in regione omopolimerica*	Esone 14
3905insT	DIV in regione omopolimerica*	Esone 23
E60X	SNV	Esone 3
R75X	SNV	Esone 3
G85E	SNV	Esone 3
E92X	SNV	Esone 4
R117H	SNV	Esone 4
Y122X	SNV	Esone 4
621+1G>T	SNV	Introne 4
G178R	SNV	Esone 5
711+1G>T	SNV	Introne 5
L206W	SNV	Esone 6
G330X	SNV	Esone 8
R334W	SNV	Esone 8
I336K	SNV	Esone 8
R347P	SNV	Esone 8
R347H	SNV	Esone 8

Variazione (Nome comune)	Tipo di variante	Regione gene CFTR
A455E	SNV	Esone 10
Q493X	SNV	Esone 11
1717-1G>A	SNV	Introne 11
G542X	SNV	Esone 12
S549N	SNV	Esone 12
S549R (c.1647T>G)	SNV	Esone 12
G551D	SNV	Esone 12
R553X	SNV	Esone 12
R560T	SNV	Esone 12
1812-1 G>A	SNV	Introne 12
1898+1G>A	SNV	Introne 13
W846X	SNV	Esone 15
2789+5G>A	SNV	Introne 16
3120+1G>A	SNV	Introne 18
3272-26A>G	SNV	Introne 19
Y1092X(C>A)	SNV	Esone 20
M1101K	SNV	Esone 20
R1158X	SNV	Esone 22
R1162X	SNV	Esone 22
3849+10kbC>T	SNV	Introne 22
W1282X	SNV	Esone 23
N1303K	SNV	Esone 24

* DIV è un acronimo per Deletion/Insertion Variant (variante delezione/inserzione).

Estrazione del DNA

Tre diversi metodi di estrazione usati comunemente e disponibili in commercio, estrazione mediante microsfere magnetiche, precipitazione alcolica e isolamento mediante colonna di gel di silice, sono stati valutati utilizzando sangue intero anticoagulato in EDTA. Nello studio sono stati utilizzati complessivamente 14 campioni di sangue univoci che rappresentavano i wild type e i tre genotipi mutanti (tre campioni con F508del, un campione con I506V e un campione con D110H). I tre metodi di estrazione del DNA sono stati analizzati indipendentemente da due diversi operatori e ciascuno di loro ha eseguito tre corse per ciascun metodo di estrazione. Ciascuna estrazione è stata eseguita da ciascun operatore in giorni diversi. La concentrazione di DNA e il rapporto A260/A280 dei campioni di gDNA estratto sono stati determinati usando spettrofotometria. La dimensione complessiva del campione per ciascun

metodo di estrazione esaminato nello studio è stato pari a 168 (14 campioni x 2 operatori/metodo di estrazione x 3 corse/operatore x 2 replicati/campioni di gDNA estratto).

Metodo di estrazione	Numero di campioni analizzati	Velocità di identificazione	Accuratezza	Percentuale di campioni "first pass"*
Precipitazione alcolica	168	100%	100%	100%
Isolamento su colonna di gel di silice	168	100%	100%	100%
Estrazione con microsfere magnetiche	168	100%	100%	100%

* La percentuale di campioni che presentano una percentuale di identificazione di > 99% nella prima corsa

DNA input

Il range di input di DNA per la piattaforma del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina è stato valutato eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano 16 varianti uniche del gene della fibrosi cistica. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a 9 livelli di input di DNA che andavano da 1250 ng a 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per la determinazione dell'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger, mentre le delezioni sono state confrontate con un saggio della PCR. 1250 ng e 25 ng sono stati identificati come il legame superiore e inferiore per l'input di DNA rispettivamente in quanto hanno ottenuto una percentuale di campioni "first pass" del ≥95% senza identificazioni errate (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con 4 campioni di DNA rappresentativi e 20 replicati per ciascun livello di input di DNA per ciascun campione (n=4x20=80 campioni), mentre il legame inferiore di 25 ng è stato analizzato con 14 campioni, 20 replicati per ciascun campione (n=14x20=280 campioni). L'accuratezza e la percentuale "first pass" dei campioni sono risultati pari al 100% a tutti i livelli di DNA input.

I risultati indicano che, per produrre risultati accurati, il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant Illumina può essere usato nel range di input di DNA da 1250 ng a 25 ng.

Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sul sistema per fibrosi cistica MiSeqDx Illumina, le prestazioni del saggio sono state valutate in presenza e in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati testati otto campioni di sangue intero inclusi tre campioni positivi CF con genotipi univoci. Quattro sostanze interferenti endogene (bilirubina, colesterolo, emoglobina e trigliceride) sono state testate aggiungendole ai campioni di sangue prima dell'estrazione del DNA. I limiti di concentrazione per ciascuna sostanza sono riportati nella tabella seguente. Inoltre, per valutare l'interferenza risultante dalla raccolta del sangue (prelievo breve), EDTA è stato aggiunto ai campioni di sangue e per valutare l'interferenza risultante dalla preparazione dei campioni; il tampone di lavaggio finale ottenuto mediante un metodo di isolamento su colonna di gel di silice è stato aggiunto al DNA genomico purificato.

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant ha raggiunto una percentuale di identificazione del 100% per tutti i campioni analizzati e una riproducibilità del 100% nell'identificazione dei genotipi tra i campioni in presenza e in assenza delle sostanze interferenti.

Per valutare l'impatto dell'interferenza dei primer indice in multiplex, è stato eseguito uno studio sulla contaminazione incrociata usando due campioni, ciascuno campione con genotipi omozigoti univoci a quattro diverse posizioni genomiche e due rispettivi primer indice. Non è stato osservato alcun cambiamento nell'identificazione delle varianti con livelli di contaminazione < 40%. Il genotipo del campione è diventato eterozigote quando i livelli di contaminazione erano ≥ 40%.

Non è stata osservata alcuna interferenza da qualsiasi interferente endogeno o esogeno.

Sostanza del test	Numero totale di replicati	Concentrazione testata nel sangue (limite superiore)	Concentrazione testata nel sangue (limite inferiore)	Percentuale di identificazione
Bilirubina	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100%
Colesterolo	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Emoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trigliceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Indicizzazione del campione

I primer di indicizzazione dei campioni sono utilizzati nel saggio per assegnare un codice a barre univoco a ciascun campione di DNA, consentendo di raggruppare in un pool più campioni in una singola corsa di sequenziamento. Sono stati testati complessivamente 96 indici di campioni mediante otto campioni di DNA unico al fine di verificare la capacità del saggio di identificare i genotipi in modo coerente per un dato campione fra diverse combinazioni di primer di indicizzazione. Ciascun campione è stato testato con 12 diverse combinazioni di primer di indicizzazione. I risultati ottenuti dai campioni sono stati confrontati con i dati del sequenziamento bidirezionale Sanger per tutte le posizioni/varianti eccetto due ampie delezioni, confermate mediante un saggio di duplex PCR. Riproducibilità e accuratezza sono risultate del 100% per tutte le combinazioni di primer indice/campione.

Riferimenti

1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genetics in Medicine 6(5): 387–391.

2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.

3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations—Correlation With Incidence Data and Application to Screening. Human Mutation 19:575 606.

4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genetics in Medicine 10(12):851–868.

5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Disponibile alla pagina Web www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Aggiornato il 19 febbraio, 2008.

6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Disponibile alla pagina Web www.uptodate.com. [Online] 7 dicembre 2012.

7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 153(2):S4–S14.

8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.

9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Disponibile alla pagina Web www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] agosto 2013.

10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. Clinical Chemistry; 57(6): 841–848.

11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Disponibile alla pagina Web www.cftr2.org. [Online] agosto 2013.

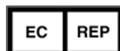
12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Disponibile alla pagina Web www.nacfconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Presentato da Garry Cutting a nome del progetto CFTR2 al 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) sponsorizzato da Cystic Fibrosis Foundation. 4 novembre 2011. Anaheim, CA, U.S.A..
13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet. 25 agosto [Epub prima della stampa].
14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (March/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. Genetics in Medicine 3(2): 149–154.
15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cystic Fibrosis 7:179–196.
16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (May 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. Journal of Molecular Diagnostics 11(3): 186–193.
17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.
18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. Genetics in Medicine 15(9): 733–747.

Brevetti e marchi registrati

Informazioni di contatto



Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH L'Aia
Paesi Bassi



Etichettatura del prodotto

Fare riferimento alla chiave dei simboli spediti con ciascun kit per un riferimento completo ai simboli che possono apparire sulla confezione e sull'etichettatura del prodotto.